

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Powered by  DIALOG

3



Pichia sp. sugar chain elongation protein - useful for prodn. of biologically active glycoprotein(s) for use in medicine

Patent Assignee: GREEN CROSS CORP; TSURA T.

Patent Family

| Patent Number | Kind | Date | Application Number | Kind | Date | Main IPC | Week | Type |
|---------------|------|----------|--------------------|------|----------|----------|------|------|
| JP 8336387 | A | 19961224 | JP 95145005 | A | 19950612 | 199710 | B | |

Priority Applications (Number Kind Date): JP 95145005 A (19950612)

Filing Details

| Patent | Kind | Language | Page | Filing Notes | Application | Patent |
|------------|------|----------|------|--------------|-------------|--------|
| JP 8336387 | A | | 21 | C12N-009/10 | | |

Abstract:

JP 8336387 A

A protein derived from yeast belonging to the genus *Pichia*, which is involved in elongating a sugar chain of a glycoprotein, and has an amino acid sequence (A) at the N-terminal region, is new:

MAKAADGSLLYYNPHNPPRRY (A). Also claimed are: (1) a protein as above having a 404 amino acid sequence; (2) DNA (I; 1212 bp) encoding for the above protein, where a part of the DNA may be modified so as to at least inhibit the production of its functional product; and (3) a modified yeast strain of the genus *Pichia* whose ability to elongate a sugar chain of glycoprotein is inhibited by having (I), as compared with a wild-type yeast of the genus *Pichia*.

USE - The modified *Pichia* strain is used for production of a glycoprotein having a sugar chain identical or similar in structure to that of a medically useful biologically active protein (claimed).

ADVANTAGE - The ability of yeast to control the elongation of sugar chains can be inhibited thus providing a glycoprotein with a sugar chain similar in structure to that of mammalian cells.

Dwg.0/12

Derwent World Patents Index

© 2000 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 11124792

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-336387

(43)公開日 平成8年(1996)12月24日

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------------------|-------|---------|---------------|--------|
| C 1 2 N 9/10 | | | C 1 2 N 9/10 | |
| C 0 7 H 21/04 | | | C 0 7 H 21/04 | B |
| C 0 7 K 14/39 | | 8517-4H | C 0 7 K 14/39 | |
| C 1 2 N 1/19 | | 7804-4B | C 1 2 N 1/19 | |
| 15/09 | Z N A | | C 1 2 P 21/00 | C |
| 審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 21 頁) 最終頁に続く | | | | |

| | | | |
|----------|-----------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平7-145005 | (71)出願人 | 000137764 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号 |
| (22)出願日 | 平成7年(1995)6月12日 | (71)出願人 | 592172921 羅 智靖 千葉県千葉市花見川区花園2-14-13 |
| | | (72)発明者 | 村上 弘次 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株 式会社ミドリ十字中央研究所内 |
| | | (72)発明者 | 杉尾 成俊 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株 式会社ミドリ十字中央研究所内 |
| | | (74)代理人 | 弁理士 高島 一 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 ビキア属酵母由来の糖鎖伸長タンパク及びそのDNA

(57)【要約】

【構成】 ビキア属酵母に由来する、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクおよびその該タンパクをコードする塩基配列を有するDNA。該DNAの塩基配列の一部が、該DNAの機能産物の産生が少なくとも抑制されるように修飾されてなるDNA、該修飾DNAを有することにより、天然型ビキア属酵母株に比して糖鎖伸長能が抑制されてなる修飾ビキア属酵母株、該修飾ビキア属酵母株を宿主として用いることを特徴とする糖蛋白質の製造方法。

【効果】 本発明によれば、医薬上有用な生理活性蛋白質と同一もしくは類似の構造の糖鎖を有する糖蛋白質をビキア属酵母を宿主として産生させるために、遺伝子レベルで該酵母が本来もつ糖鎖伸長能を抑制する方法の提供が可能。本発明の修飾ビキア酵母株を用いることにより、酵母と哺乳類細胞とで共通するERコア糖鎖と同一もしくは類似の糖鎖構造を有する糖蛋白質が調製可能。

1

2

【特許請求の範囲】

* 来する、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパク。

【請求項1】 実質的に下記に示されるアミノ酸配列を

【化1】

N末端領域に有することを特徴とするピキア属酵母に由*

Met-Ala-Lys-Ala-Asp-Gly-Ser-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Asn-Pro-His-Asn-Pro-

Pro-Arg-Arg-Tyr

〔式I〕

【請求項2】 実質的に下記に示されるアミノ酸配列を

* 由来する、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパク。

有することを特徴とする請求項1記載のピキア属酵母に*

【化2】

Met-Ala-Lys-Ala-Asp-Gly-Ser-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Asn-Pro-His -

Asn-Pro-Pro-Arg-Arg-Tyr-Tyr-Phe-Tyr-Met-Ala-Ile-Phe-Ala-Val-Ser -

Val-Ile-Cys-Val-Leu-Tyr-Gly-Pro-Ser-Gln-Gln-Leu-Ser-Ser-Pro-Lys -

Ile-Asp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Leu-Arg-Ser-Leu-Asp-Leu-Lys-Thr-Leu-

Glu-Ala-Pro-Ser-Gln-Leu-Ser-Pro-Gly-Thr-Val-Glu-Asp-Asn-Leu-Arg -

Arg-Gln-Leu-Glu-Phe-His-Phe-Pro-Tyr-Arg-Ser-Tyr-Glu-Pro-Phe-Pro -

Gln-His-Ile-Trp-Gln-Thr-Trp-Lys-Val-Ser-Pro-Ser-Asp-Ser-Ser-Phe -

Pro-Lys-Asn-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-Glu-Ser-Trp-Leu-Gln-Arg-Ser-Pro -

Asn-Tyr-Asp-His-Phe-Val-Ile-Pro-Asp-Asp-Ala-Ala-Trp-Glu-Leu-Ile -

His-His-Glu-Tyr-Glu-Arg-Val-Pro-Glu-Val-Leu-Glu-Ala-Phe-His-Leu -

Leu-Pro-Glu-Pro-Ile-Leu-Lys-Ala-Asp-Phe-Phe-Arg-Tyr-Leu-Ile-Leu -

Phe-Ala-Arg-Gly-Gly-Leu-Tyr-Ala-Asp-Met-Asp-Thr-Met-Leu-Leu-Lys -

Pro-Ile-Glu-Ser-Trp-Leu-Thr-Phe Asn-Glu-Thr-Ile-Gly-Gly-Val-Lys -

Asn-Asn-Ala-Gly-Leu-Val-Ile-Gly-Ile-Glu-Ala-Asp-Pro-Asp-Arg-Pro -

Asp-Trp-His-Asp-Trp-Tyr-Ala-Arg-Arg-Ile-Gln-Phe-Cys-Gln-Trp-Ala -

Ile-Gln-Ser-Lys-Arg-Gly-His-Pro-Ala-Leu-Arg-Glu-Leu-Ile-Val-Arg -

Val-Val-Ser-Thr-Thr-Leu-Arg-Lys-Glu-Lys-Ser-Gly-Tyr-Leu-Asn-Met -

Val-Glu-Gly-Lys-Asp-Arg-Gly-Ser-Asp-Val-Met-Asp-Trp-Thr-Gly-Pro -

Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Thr-Leu-Phe-Asp-Tyr-Met-Thr-Asn-Val-Asn-Thr -

Thr-Gly-His-Ser-Gly-Gln-Gly-Ile-Gly-Ala-Gly-Ser-Ala-Tyr-Tyr-Asn -

Ala-Leu-Ser-Leu-Glu-Glu-Arg-Asp-Ala-Leu-Ser-Ala-Arg-Pro-Asn-Gly -

Glu-Met-Leu-Lys-Glu-Lys-Val-Pro-Gly-Lys-Tyr-Ala-Gln-Gln-Val-Val -

Leu-Trp-Glu-Gln-Phe-Thr-Asn-Leu-Arg-Ser-Pro-Lys-Leu-Ile-Asp-Asp -

Ile-Leu-Ile-Leu-Pro-Ile-Thr-Ser-Phe-Ser-Pro-Gly-Ile-Gly-His-Ser -

Gly-Ala-Gly-Asp-Leu-Asn-His-His-Leu-Ala-Tyr-Ile-Arg-His-Thr-Phe -

Glu-Gly-Ser-Trp-Lys-Asp

〔式II〕

【請求項3】 請求項1または2に記載の糖蛋白質の糖 50 鎖伸長に携わるタンパクをコードする塩基配列を有する

DNA。

*タンパクをコードするDNA。

【請求項4】 下記に示される塩基配列を有することを

【化3】

特徴とする請求項3記載の糖蛋白質の糖鎖伸長に携わる*

ATGGCGAAGG CAGATGGCAG TTTGCTCTAC TATAATCCTC ACAATCCACC CAGAAGGTAT
TACTTCTACA TGGCTATATT CGCCGTTTCT GTCATTTGCG TTTTGTACGG ACCCTCACAA
CAATTATCAT CTCCAAAAT AGACTATGAT CCATTGACGC TCCGATCACT TGATTGAAG
ACTTTGGAAG CTCCTTCACA GTTGAGTCCA GGCACCGTAG AAGATAATCT TCGAAGACAA
TTGGAGTTTC ATTTTCCTTA CCGCAGTTAC GAACCTTTTC CCCAACATAT TTGGCAAACG
TGGAAAGTTT CTCCCTCTGA TAGTTCCTTT CCGAAAACT TCAAAGACTT AGGTGAAACT
TGGCTGCAAA GGTCCCCAAA TTATGATCAT TTTGTGATAC CCGATGATGC AGCATGGGAA
CTTATTCACC ATGAATACGA ACGTGATCCA GAAGTCTTGG AAGCTTTCCA CCTGCTACCA
GAGCCCATTC TAAAGGCCGA TTTTTCAGG TATTTGATTC TTTTGGCCG TGGAGGACTG
TATGCTGACA TGGACACTAT GTTATTAATA CCAATAGAAT CGTGGCTGAC TTTCAATGAA
ACTATTGGTG GAGTAAAAA CAATGCTGGG TTGGTCATTG GTATTGAGGC TGATCCTGAT
AGACCTGATT GGCACGACTG GTATGCTAGA AGGATACAAT TTTGCCAATG GGCAATTCAG
TCCAAACGAG GACACCCAGC ACTGCGTGAA CTGATTGTAA GAGTTGTCAG CACGACTTTA
CGGAAAGAGA AAAGCGGTTA CTTGAACATG GTGAAGGAA AGGATCGTGG AAGTGATGTG
ATGGACTGGA CGGGTCCAGG AATATTTACA GACACTCTAT TTGATTATAT GACTAATGTC
AATACAACAG GCCACTCAGG CCAAGGAATT GGAGCTGGCT CAGCGTATTA CAATGCCTTA
TCGTTGGAAG AACGTGATGC CCTCTCTGCC CGCCCGAAGC GAGAGATGTT AAAAGAGAAA
GTCCCAGGTA AATATGCACA GCAGGTTGTT TTATGGGAAC AATTTACCAA CCTGCGCTCC
CCCAAATTAA TCGACGATAT TCTTATTCTT CCGATCACCA GCTTCAGTCC AGGGATTGGC
CACAGTGGAG CTGGAGATTT GAACCATCAC CTTGCATATA TTAGGCATAC ATTTGAAGGA
AGTTGGAAGG AC

〔式Ⅲ〕

【請求項5】 請求項3または4記載の糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクをコードするDNAの一部が、該DNAの機能産物の産生が少なくとも抑制されるように修飾されてなるDNA。

【請求項6】 修飾の態様が、請求項3または4記載の糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクをコードするDNAの塩基配列への形質転換マーカー遺伝子の挿入である請求項5記載のDNA。

【請求項7】 形質転換マーカー遺伝子が、パン酵母由来SUC2遺伝子、ピキア属酵母由来のHIS4遺伝子、ARG4遺伝子、URA3遺伝子およびG418耐性遺伝子からなる群から選択されるものであることを特徴とする請求項6記載のDNA。

【請求項8】 請求項5～7のいずれかのDNAを有することにより、天然型ピキア属酵母株に比して糖蛋白質の糖鎖伸長能が抑制されてなる修飾ピキア属酵母株。

【請求項9】 請求項8記載の修飾ピキア属酵母株を宿主細胞として用いることを特徴とする糖蛋白質の製造方法。

【請求項10】 糖蛋白質が可溶性高親和性IgE受容体 α 鎖(sFc ϵ R1 α)、キマーゼ、プロウロキナーゼ-アネキシンV融合タンパク、尿性トリプシンインヒビター、IGF1結合蛋白質3(IGF1BP3)からなる群から選択されるいずれかであることを特徴とする請求項9記載の糖蛋白質の製造方法。

50 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、組換え産物生産のための有効な発現系の宿主として利用され得るピキア属酵母に由来する、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクおよびその遺伝子に関する。当該タンパクは、ピキア属酵母を宿主とする糖蛋白質発現系において産生される糖蛋白質における糖鎖の伸長、好ましくは α -1, 6結合マンノースの伸長に関与するものである。また本発明は、ピキア属酵母に由来する、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクの遺伝子を修飾してなるDNAおよび該DNAを有する修飾ピキア属酵母株、該修飾ピキア属酵母株を宿主として用いる糖蛋白質の製造方法に関する。医学上有用な生理活性蛋白質のほとんどは糖蛋白質であるが、本発明の修飾ピキア属酵母株を宿主とする蛋白質発現系によれば、酵母と哺乳類細胞とで共通するERコア糖鎖と同一構造のMan₈GlcNAc₂糖鎖のみを有する糖蛋白質を調製し得る。従って、本発明の修飾ピキア属酵母株は、医薬上有用な糖蛋白質を産生するための宿主として有用である。

【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】生体内で機能する蛋白質の殆どは、糖鎖による修飾を受けた糖蛋白質である。近年、糖鎖の構造については、レクチンを用いた解析等の従来の方法に加え、HPLCやNMR、FAB-MASを用いた新しい分析法等が開発され、次々と新しい糖蛋白質の糖鎖構造が解明されてきている。一方、多くの研究者によって糖鎖の機能解析の研究も盛んとなり、糖鎖は細胞間認識、分子識別、蛋白質の構造維持や活性への寄与、生体内でのクリアランス、分泌、局在化など多くの生体内機構に重要な役割を担っていることがわかってきた。

【0003】例えば、糖鎖構造とその機能がよく研究されているヒト・エリスロポエチン〔竹内、蛋白質・核酸・酵素、増刊「複合糖質」37, 1713 (1992) 参照〕においては、エリスロポエチンに付加されているアスパラギン結合型糖鎖は(図1にその機能分担モデルを示す)、その先端部分のNeu5Ac(シアル酸)が血中クリアランス、分岐部分のGal/GalNAc基(ガラクトース/N-アセチルガラクトサミン)は受容体との結合に関する立体的な寄与、そしてコア部分はペプチドの活性発現維持の関与と多岐にわたる機能に関与していることが報告されている。このように糖蛋白質の糖鎖は、その構造が複雑であるだけでなく機能也多岐に渡っていることから、特に医薬品として糖蛋白質を開発する場合にはその構造および機能解析が重要である。

【0004】ところで、微生物を用いた物質生産は、その生産コストの低さや、これまで醗酵工学として培ってきた培養技術など、動物細胞を用いた物質生産に比べると、いくつかの点で有利である。しかしながら、微生物においてはヒト糖蛋白質と同一の糖鎖(例えば上述した

エリスロポエチンにおいて機能している上記糖鎖)を付加することができないという問題がある。つまり、ヒトを含め動物細胞由来の糖蛋白質は、図1で示したような複合型、さらに混成型およびハイマンノース型の3種類のアスパラギン結合型糖鎖に加え、多種多様のムチン型糖鎖を有しているが、大腸菌等の原核微生物では糖鎖付加自体が起こらず、また真核微生物であるパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)でも付加されるアスパラギン結合型糖鎖はハイマンノース型のみで、ムチン型はマンノースのみを主成分とする糖鎖しか付加されない。従って、上述したエリスロポエチン等のように糖鎖が重要な機能を持っている糖蛋白質の遺伝子組換え生産には、微生物は適しておらず、実際にエリスロポエチンの生産にはチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO細胞)が用いられている。

【0005】これに対しパン酵母等の真核微生物の遺伝子工学的な分子育種を行い、パン酵母細胞内で動物細胞と同一あるいは類似の構造の糖鎖を付加させようとする研究も行われ始めている。1994年、Schwientekらはパン酵母でヒト由来 β -1,4-galactosyltransferase遺伝子の活性発現の成功を報告している〔Schwientek, T. and Ernst, J.F., Gene, 145, 299 (1994)〕。また、Krezdornらも同様の研究を進めており、同じくパン酵母でヒト由来 β -1,4-galactosyltransferase及び α -2,6-sialyltransferaseの活性発現を行っている〔Krezdorn, C.H., et al., Eur. J. Biochem. 220, 809 (1994)〕。

【0006】また、一方でパン酵母由来の糖蛋白質の糖鎖自体の改変を目的とする試みが行われている。パン酵母由来の糖蛋白質に付加されるハイマンノース型糖鎖は動物細胞のハイマンノース型糖鎖よりもさらにマンノースを多量に含む、いわゆるHypermannosylationされた糖鎖が多数を占めており、この過剰に付加されたマンノースのうち、 β 結合したマンノースに α -1,3結合したマンノース残基を出発点として伸長する α -1,6結合マンノースや外糖鎖に付加される α -1,3結合マンノース等はパン酵母特有の構造である(図2)。

【0007】1992年、地神らはこの α -1,6結合マンノースの伸長の鍵酵素であると考えられているパン酵母のOCH1遺伝子(α -1,6-mannosyltransferaseを発現する)のクローニングに成功した〔Nakayama, K., EMBO J., 11, 2511 (1992)、図2参照〕。このOCH1遺伝子の破壊株($\Delta och1$)の糖蛋白質には、Man₈GlcNAc₂、Man₉GlcNAc₂、Man₁₀GlcNAc₂の3種の糖鎖が付加されており、このうちMan₈GlcNAc₂糖鎖は、哺乳類細胞で共通するERコア糖鎖と同一の構造(図2中、「Ma」で記載した構造)で、Man₉GlcNAc₂、Man₁₀GlcNAc₂の糖鎖は、このERコア糖鎖に α -1,3結合マンノースが付加された構造〔Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K., Tanaka, A., Toda, Y. and Jigami, Y., (1994), J. Bio

l.Chem.]であった。さらに、 $\Delta och1$, $mnn1$ 二重変異株(図2参照)を作製して末端の α -1,3結合マンノース転移を阻害することにより、パン酵母と哺乳類細胞で共通するERコア糖鎖と同一構造のMan₈GlcNAc₂糖鎖のみを生成するパン酵母宿主を作製できた。この $\Delta och1$, $mnn1$ 二重変異株は、ハイマンノース型糖鎖を有する哺乳類由来の糖蛋白質を遺伝子組換え技術により生産する際に有用な宿主となると考えられている〔地神芳文(1994)蛋白質・核酸・酵素, 39, 657〕。

【0008】ところで、近年、メタノール資化性酵母であるピキア属酵母(*Pichia pastoris*等)が異種蛋白発現系の有効な宿主として注目を浴びている。ピキア属酵母は、特にその分泌発現量がパン酵母を大きく上回っており、また培養技術が確立しているため工業生産に用いられる酵母として大変好適に用いられる。しかしながら、ピキア属酵母が有する糖蛋白質の糖鎖伸長機構やピキア属酵母によって産生される蛋白質の糖鎖構造等についての研究はほとんど行われていないのが現状である。

【0009】従って、本発明の目的は、ピキア属酵母に由来する糖鎖伸長に携わるタンパク及びその遺伝子を提供することである。ピキア属酵母に由来する糖鎖伸長に携わるタンパク及びその遺伝子は、本発明によって初めて提供されるものである。また本発明は、当該タンパクの遺伝子の解明に基づいて、糖鎖伸長に携わるタンパクの遺伝子の機能産物の産生が少なくとも抑制されるように修飾されてなるDNA、該DNAを有することにより天然型ピキア属酵母株に比して糖鎖伸長能が抑制されてなる修飾ピキア属酵母株、および当該修飾ピキア属酵母株を宿主として用いることを特徴とする糖蛋白質の製造法を提供することを目的とする。当該修飾ピキア属酵母株は、哺乳類由来の糖蛋白質と同一もしくは類似の糖鎖構造を有する糖蛋白質を遺伝子組換え技術により生産する際に有用な宿主となり得る点で有用である。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ピキア属酵母を宿主として種々の生理活性蛋白質の産生を行っているが、上述のように生理活性蛋白質の殆どは糖蛋白質であることから、ピキア属酵母を組換え生産の宿主とする場合、糖蛋白質の糖鎖の問題は避けられない問題である。そこで、かかる問題を解決すべく種々研究を重ねた*

Met-Ala-Lys-Ala-Asp-Gly-Ser-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Asn-Pro-His-Asn-Pro-

Pro-Arg-Arg-Tyr

【0016】

*ところ、ピキア属酵母に由来する糖鎖伸長に携わるタンパクをコードする遺伝子のクローニングに成功し、当該タンパクがピキア属酵母を宿主とする発現系において、糖蛋白質の糖鎖の伸長に関与していることを確認して本発明を完成した。

【0011】すなわち本発明は、ピキア属酵母に由来する、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクおよびその該タンパクをコードする塩基配列を有するDNAに関する。また本発明は、当該糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクをコードするDNAの塩基配列の一部が、該DNAの機能産物の産生が少なくとも抑制されてなるように修飾されてなるDNA、好ましくは糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクをコードするDNAに形質転換マーカー遺伝子が挿入されてなるDNAに関する。さらに本発明は、当該修飾DNAを有することにより、天然型ピキア属酵母株に比して糖鎖伸長能が抑制されてなる修飾ピキア属酵母株、当該修飾ピキア属酵母株を宿主として用いることを特徴とする糖蛋白質の製造方法に関する。

【0012】以下、本発明について詳細に説明する。

(1) 糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパク

本発明のタンパクは、原始的にはピキア属酵母によって産生されるタンパクであり、糖蛋白質の糖鎖の伸長の最初の段階をつかさどっており、糖鎖の伸長を制御する機能を有することを特徴とする。

【0013】本発明のタンパクの由来となるピキア属酵母としては、特に制限はないが、具体的には *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichiakoclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*等が例示される。好ましくは *Pichia pastoris* (以下、*P.pastoris*という)である。

【0014】本発明のタンパクは原始的にピキア属酵母に由来するものであり、かつ上記機能を有するものであれば特に制限されないが、好ましくはN末端領域に式Iで示されるアミノ酸配列を有するタンパクであり、より好ましくは実質的に式IIで示されるアミノ酸配列を有するタンパクである。

【0015】

【化4】

〔式I〕

【化5】

9

10

Met-Ala-Lys-Ala-Asp-Gly-Ser-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Asn-Pro-His-
 Asn-Pro-Pro-Arg-Arg-Tyr-Tyr-Phe-Tyr-Met-Ala-Ile-Phe-Ala-Val-Ser-
 Val-Ile-Cys-Val-Leu-Tyr-Gly-Pro-Ser-Gln-Gln-Leu-Ser-Ser-Pro-Lys-
 Ile-Asp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Leu-Arg-Ser-Leu-Asp-Leu-Lys-Thr-Leu-
 Glu-Ala-Pro-Ser-Gln-Leu-Ser-Pro-Gly-Thr-Val-Glu-Asp-Asn-Leu-Arg-
 Arg-Gln-Leu-Glu-Phe-His-Phe-Pro-Tyr-Arg-Ser-Tyr-Glu-Pro-Phe-Pro-
 Gln-His-Ile-Trp-Gln-Thr-Trp-Lys-Val-Ser-Pro-Ser-Asp-Ser-Ser-Phe-
 Pro-Lys-Asn-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly-Glu-Ser-Trp-Leu-Gln-Arg-Ser-Pro-
 Asn-Tyr-Asp-His-Phe-Val-Ile-Pro-Asp-Asp-Ala-Ala-Trp-Glu-Leu-Ile-
 His-His-Glu-Tyr-Glu-Arg-Val-Pro-Glu-Val-Leu-Glu-Ala-Phe-His-Leu-
 Leu-Pro-Glu-Pro-Ile-Leu-Lys-Ala-Asp-Phe-Phe-Arg-Tyr-Leu-Ile-Leu-
 Phe-Ala-Arg-Gly-Gly-Leu-Tyr-Ala-Asp-Met-Asp-Thr-Met-Leu-Leu-Lys-
 Pro-Ile-Glu-Ser-Trp-Leu-Thr-Phe-Asn-Glu-Thr-Ile-Gly-Gly-Val-Lys-
 Asn-Asn-Ala-Gly-Leu-Val-Ile-Gly-Ile-Glu-Ala-Asp-Pro-Asp-Arg-Pro-
 Asp-Trp-His-Asp-Trp-Tyr-Ala-Arg-Arg-Ile-Gln-Phe-Cys-Gln-Trp-Ala-
 Ile-Gln-Ser-Lys-Arg-Gly-His-Pro-Ala-Leu-Arg-Glu-Leu-Ile-Val-Arg-
 Val-Val-Ser-Thr-Thr-Leu-Arg-Lys-Glu-Lys-Ser-Gly-Tyr-Leu-Asn-Met-
 Val-Glu-Gly-Lys-Asp-Arg-Gly-Ser-Asp-Val-Met-Asp-Trp-Thr-Gly-Pro-
 Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Thr-Leu-Phe-Asp-Tyr-Met-Thr-Asn-Val-Asn-Thr-
 Thr-Gly-His-Ser-Gly-Gln-Gly-Ile-Gly-Ala-Gly-Ser-Ala-Tyr-Tyr-Asn-
 Ala-Leu-Ser-Leu-Glu-Glu-Arg-Asp-Ala-Leu-Ser-Ala-Arg-Pro-Asn-Gly-
 Glu-Met-Leu-Lys-Glu-Lys-Val-Pro-Gly-Lys-Tyr-Ala-Gln-Gln-Val-Val-
 Leu-Trp-Glu-Gln-Phe-Thr-Asn-Leu-Arg-Ser-Pro-Lys-Leu-Ile-Asp-Asp-
 Ile-Leu-Ile-Leu-Pro-Ile-Thr-Ser-Phe-Ser-Pro-Gly-Ile-Gly-His-Ser-
 Gly-Ala-Gly-Asp-Leu-Asn-His-His-Leu-Ala-Tyr-Ile-Arg-His-Thr-Phe-
 Glu-Gly-Ser-Trp-Lys-Asp

〔式II〕

【0017】なお、かかるアミノ酸配列は、上述の特性を変更しない範囲で、一部が修飾（例えば、アミノ酸残基またはペプチド鎖の置換、欠失、挿入または付加等）されていてもよい。

【0018】本発明のタンパクは、その一次構造として例示される式II記載のアミノ酸配列が、パン酵母に由来する α -1,6結合マンノース伸長の鍵酵素、 α -1,6-mannosyltransferaseのアミノ酸配列と高い相同性（約40%）を有し、また後述するようにそのDNAもパン酵母

に由来する該酵素をコードするOCH1遺伝子と高い相同性（約55%）を有すること等から、ビキア属酵母に由来する α -1,6結合マンノース伸長の鍵酵素である可能性が高い。

【0019】本発明のタンパクは、ビキア属酵母を常法に従って、好ましくは該酵母の増殖に適した条件下で培養し、培養菌体から常法により抽出、精製することにより製造することができる。また、本発明で例示するアミノ酸配列に基づいてポリペプチド合成したり、また本発

明で例示する塩基配列に基づいて慣用の組換えDNA技術によっても製造することができる。なお、以下説明を簡便にするため、本発明のタンパクを糖鎖伸長タンパクともいう。

【0020】(2) 糖鎖伸長タンパクをコードする塩基配列を有するDNA

本発明のDNAは、前述の本発明のピキア属酵母に由来する糖鎖伸長タンパクをコードする塩基配列を有するこ*

ATGGCGAAGG CAGATGGCAG TTGCTCTAC TATAATCCTC ACAATCCACC CAGAAGGTAT
TACTTCTACA TGGCTATATT CGCCGTTTCT GTCATTTGCG TTTTGTACGG ACCCTCACAA
CAATTATCAT CTCCAAAAAT AGACTATGAT CCATTGACGC TCCGATCACT TGATTGAAG
ACTTTGGAAG CTCCTTCACA GTTGAGTCCA GGCACCGTAG AAGATAATCT TCGAAGACAA
TTGGAGTTTC ATTTTCCTTA CCGCAGTTAC GAACCTTTTC CCCAACATAT TTGGCAAACG
TGGAAAGTTT CTCCCTCTGA TAGTTCCTTT CCGAAAACT TCAAAGACTT AGGTGAAAGT
TGGCTGCAAA GGTCCCAAAA TTATGATCAT TTTGTGATAC CCGATGATGC AGCATGGGAA
CTTATTCACC ATGAATACGA ACGTGATCCA GAAGTCTTGG AAGCTTTCCA CCTGCTACCA
GAGCCCATTC TAAAGGCCGA TTTTTCAGG TATTTGATTC TTTTGGCCG TGGAGGACTG
TATGCTGACA TGGACACTAT GTTATTAATA CCAATAGAAT CGTGGCTGAC TTTCAATGAA
ACTATTGGTG GAGTAAAAAA CAATGCTGGG TTGTCATTG GTATTGAGGC TGATCCTGAT
AGACCTGATT GGCACGACTG GTATGCTAGA AGGATACAAT TTTGCCAATG GGCAATTCAG
TCCAAACGAG GACACCCAGC ACTGCGTGAA CTGATTGTAA GAGTTGTCAG CACGACTTTA
CGGAAAGAGA AAAGCGGTTA CTTGAACATG GTGGAAGGAA AGGATCGTGG AAGTGATGTG
ATGGACTGGA CGGGTCCAGG AATATTTACA GACACTCTAT TTGATTATAT GACTAATGTC
AATACAACAG GCCACTCAGG CCAAGGAATT GGAGCTGGCT CAGCGTATTA CAATGCCTTA
TCGTTGGAAG AACGTGATGC CCTCTCTGCC CGCCCGAACG GAGAGATGTT AAAAGAGAAA
GTCCCAGGTA AATATGCACA GCAGGTTGTT TTATGGGAAC AATTTACCAA CCTGCGCTCC
CCCAAATTAA TCGACGATAT TCTTATTCTT CCGATCACCA GCTTCAGTCC AGGGATTGGC
CACAGTGGAG CTGGAGATTT GAACCATCAC CTTGCATATA TTAGGCATAC ATTTGAAGGA
AGTTGGAAGG AC

*とを特徴とするものである。かかる塩基配列は、本発明の糖鎖伸長タンパクをコードし得る塩基配列であれば特に制限されないが、好適には式Iで示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、より好ましくは実質的に下記式IIIで示される塩基配列が例示される。

【0021】

〔化6〕

〔式III〕

【0022】当該DNAは、従来公知の手法により製造することができる。例えば、本発明で例示する塩基配列をもとにDNA合成機を用いてその一部または全てのDNAを合成したり、ピキア属酵母（例えば*P. pastoris*）の染色体DNAを用いてPCR法で増幅させることにより製造することも可能である。

【0023】本発明のDNAは、ピキア属酵母によって産生される、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクの遺

伝子として、本発明により初めて提供されるものである。従って、本発明のDNAはピキア属酵母を宿主とする糖蛋白質発現系における糖蛋白質の糖鎖の構造・機能等の機序を解明する上で極めて有用である。

【0024】本発明の糖鎖伸長タンパクは、ピキア属酵母を宿主として産生される蛋白質のコア糖鎖にさらに α -1, 6結合マンノースを転移する働きを有し、動物細胞由来の糖蛋白質に比べて過剰にマンノースを付加させ

てしまう。従って、本発明による糖鎖伸長タンパクの遺伝子の解明は、ピキア属酵母を宿主として、医薬上有用な生理活性蛋白質と同一もしくは類似の糖鎖構造を有する糖蛋白質を発現・産生させるために、遺伝子レベルでピキア属酵母が本来有する糖鎖伸長能を減弱または除去する方法の提供にもつながる。すなわち、本発明の糖鎖伸長タンパクが本来的に有する糖鎖伸長活性の減弱または除去は、本発明の糖鎖伸長タンパクをコードする塩基配列を有するDNA（以下、糖鎖伸長DNA、もしくは後述の修飾糖鎖伸長DNAと区別するため天然型糖鎖伸長DNAともいう）を、該DNAが本来産生する機能産物の産生を少なくとも抑制するように修飾することによって達成することができる。

【0025】（3）天然型糖鎖伸長DNAが修飾されるDNA

本発明は、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクをコードするDNA（天然型糖鎖伸長DNA）の修飾物、すなわちピキア属酵母に由来する、糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクをコードするDNAの塩基配列の一部が、該DNAの機能産物の産生を少なくとも抑制されるように修飾されてなるDNAに関する。

【0026】ここで「DNAの機能産物」とは、ピキア属酵母に由来する天然型糖鎖伸長DNAによって産生されるタンパク、すなわち本発明の糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクをいうが、前述する当該タンパクと同一の機能を有している限り、ここでいう機能産物に包含される。ここで「機能」とは、本発明の糖鎖伸長タンパクが有する糖鎖合成・伸長に関する機能（活性）、具体的には、「少なくともコア糖鎖に α -1, 6結合マンノースを転移する」活性（本明細書において、「糖鎖伸長活性」という。）を意味する。また「機能産物の産生が少なくとも抑制」とは、発現せず本発明の天然型糖鎖伸長DNAがコードするタンパクを全く産生しない場合のみならず、発現しても得られる産物が本発明の天然型糖鎖伸長DNAの機能産物と同一でなくその機能が減弱される場合（即ち、産物が、天然型糖鎖伸長DNAの機能産物が有する糖鎖伸長活性を全く有しない場合および天然型糖鎖伸長DNAの機能産物が有する糖鎖伸長活性に比して低い活性を有する場合）をも含めて意味するものである。

【0027】従って、DNAの修飾の態様は、遺伝子の発現を不能ならしめるもの、または修飾された糖鎖伸長DNAの発現・生成物が、天然型糖鎖伸長DNAの生成物が本来有する糖鎖伸長活性を全く有しないか、有していても天然型糖鎖伸長DNAの生成物の糖鎖伸長活性に比して減弱せしめてなるようなものであれば、特に制限されない。具体的には、天然型糖鎖伸長DNAの塩基配列中の少なくとも一つのヌクレオチドが欠失されているかもしくは配列中に少なくとも一つのヌクレオチドが挿入される態様の修飾が例示される。さらに、天然型糖鎖

伸長DNAの塩基配列中の少なくとも一つのヌクレオチドが置換されることも修飾の態様に含まれる。かかる修飾により、読み枠がずれ、あるいは塩基配列が改変されるため、発現されないか、発現されても得られる生成物の機能が、天然型DNA由来の生成物の機能と異なるものとなる。

【0028】好適な修飾方法としては、天然型糖鎖伸長DNAのコード領域内に形質転換のマーカ―遺伝子を挿入する方法が挙げられる。これによると、天然型糖鎖伸長DNAを破壊することができるとともに、導入された形質転換のマーカ―遺伝子を指標として、該修飾型糖鎖伸長DNAを有する変異体を容易にスクリーニングすることができるという利点がある。また、形質転換マーカ―遺伝子に加えて、産生しようとする糖蛋白質の遺伝子を挿入することもできる。これによると、該糖鎖伸長DNAの修飾と産生しようとする糖蛋白質の発現が同時に一度の操作で行うことができる。

【0029】用いられる形質転換マーカ―遺伝子としては、*P. pastoris*またはパン酵母のHIS4遺伝子、ARG4遺伝子、URA3遺伝子、SUC2遺伝子、G418耐性遺伝子等が例示される。好ましくは、HIS4遺伝子である。また、糖蛋白質の遺伝子としては、製造しようとする所望の糖蛋白質のDNAであれば特に制限されないが、具体的には可溶性高親和性IgE受容体 α 鎖（sFc ϵ R1 α 、特開平6-169776号公報）、インターフェロン α （特開昭61-185189号公報）、ウロキナーゼ（特開昭60-180591号公報）、キマーゼ（Caughey, G.H., et al., J. Biol. Chem. 266, 12956(1991)）、尿性トリプシンインヒビター（Kaumeyer, J.F., et al., Nucleic Acids Res. 14, 7839(1986)）、IGF結合蛋白質（IGF1BP3、特表平3-505397号公報）などが例示される。

【0030】（4）修飾ピキア属酵母株

本発明の修飾ピキア属酵母株は、前述の修飾糖鎖伸長DNAを有することに基づいて、天然型ピキア属酵母株に比して糖鎖伸長能が抑制されてなるピキア属酵母株である。すなわち、天然型糖鎖伸長DNAの代わりに上述の修飾型糖鎖伸長DNAを有するピキア属酵母であり、天然型糖鎖伸長DNAの機能産物の活性が減弱されるか、または活性が発現されない。

【0031】このような修飾ピキア属酵母株は、種々の方法により調製することができる。例えば、天然型ピキア属酵母中の天然型糖鎖伸長DNAの修飾、または天然型ピキア属酵母株に無作為的な変異を起こさせ、天然型ピキア属酵母株に比して糖鎖伸長活性が抑制されてなる突然変異体を選択する方法が挙げられる。天然型糖鎖伸長DNAの修飾により、修飾ピキア属酵母株を作成する方法は、具体的には天然型糖鎖伸長DNAの特定座位において形質導入するDNAを部位特異的組み込み法により導入することにより実施される。形質導入したDNA

は、宿主の内在性の天然型DNAに置き換わることでより組み込まれる。酵母宿主の標的座位内への形質導入DNAの導入に都合のよい方法は、標的遺伝子DNA断片の内部に欠落、あるいは選択マーカー遺伝子DNAや異種遺伝子発現DNA断片を挿入した直鎖状DNA断片を作製することである。これにより形質転換によって、その発現生成物が糖鎖伸長活性に影響を与えるDNAの特定部位での相長的組換えを起こすように方向付けられる。

【0032】好ましくは、本発明の修飾糖鎖伸長DNAを用いて天然型ピキア属酵母を形質転換する方法である。天然型ピキア属酵母を形質転換する方法ならびに当該酵母細胞の培養方法は、当該分野で採用される通常の方法を用いることができる。例えば、形質転換方法としては、スフェロプラスト方法 [Creggh et al., Mol. Cell Biol., 5, 3376 (1985)、米国特許第4,879,231号]、塩化リチウム法 [Ito et al., Agric. Biol. Chem., 48, 341 (1984)、欧州特許出願第312,934号、米国特許第4,929,535号] 等が用いられる。

【0033】形質転換に用いられる天然型ピキア属酵母由来の宿主細胞は、特に制限されないが、好ましくは唯一の炭素源およびエネルギー源としてメタノールを効率よく利用できるメタノール資化性酵母 (methylotrophic) 酵母である。適切なメタノール資化性酵母としては、具体的には栄養要求性 *P. pastoris* GTS115株 (NRRL Y-15851)、*P. pastoris* GS190株 (NRRL Y-18014)、*P. pastoris* PPF1株 (NRRL Y-18017)、野生型 *P. pastoris* 株 (NRRL Y-11430、NRRL Y-11431) 等が例示される。

【0034】また、さらに好ましくは、少なくとも一つの独立栄養性マーカー遺伝子が欠失した株であり、例えば *HIS4* 欠失 *P. pastoris* GS115株 (ATCC 20864)、*ARG4* 欠失 *P. pastoris* GS190株、*HIS4/URA3* 欠失 *P. pastoris* GS4-2株、*HIS4/URA4* 欠失 *P. pastoris* PPF1株 (NRRL Y-18017: 米国特許第4,812,405号参照) 等が挙げられる。このように宿主細胞が少なくとも一つの独立栄養性マーカー遺伝子が欠失した株である場合は、形質導入するDNAとして、宿主細胞に欠失している独立栄養性マーカー遺伝子を有するものを用いることが好ましい。かかる方法によると、形質導入するDNAが取り込まれて糖鎖伸長DNAが修飾された形質転換体 (修飾ピキア属酵母株) を迅速かつ簡便に同定、選択することができる点で有用である。

【0035】当該修飾ピキア属酵母株は、さらに天然培地 (例えば、YPD培地 (1%イーストエキストラクト、2%ペプトン、2%グルコース)、YPM培地 (1%イーストエキストラクト、2%ペプトン、2%メタノール) 等) などの栄養条件下で天然型ピキア属酵母株と

同等の増殖能力を保持しているという特徴を有する。このことは、糖鎖伸長DNAの修飾の有無は、栄養条件下ではピキア属酵母の生育に影響を与えないことを意味する。従って、本発明の修飾ピキア属酵母株は、医薬上有用な糖蛋白質産生のための優れた宿主となる。すなわち、当該酵母は天然型ピキア属酵母株に比して宿主細胞に由来する糖鎖伸長能が減弱もしくは消失しているため、哺乳動物細胞、なかんずくはヒトに由来する細胞が産生する糖蛋白質と同一または類似の糖鎖構造を有する糖蛋白質を産生することができる。

【0036】上述の哺乳動物細胞、なかんずくはヒトに由来する細胞が産生する糖蛋白質と同一または類似の糖鎖構造を有する糖蛋白質としては、蛋白質分子上に糖鎖構造を有する糖蛋白質であれば特に制限されないが、好ましくは医薬上有用な生理活性蛋白質、具体的には、可溶性高親和性IgE受容体 α 鎖 (sFc ϵ R1 α)、表皮増殖因子 (EGF)、成長ホルモン放出因子 (GRF)、IGF1結合蛋白質3 (IGF1BP3)、プロウロキナーゼ・アネキシンV融合蛋白質、キマーゼ、尿性トリプシンインヒビターなどが例示される。

【0037】糖蛋白質産生のために有用な発現系は、種々の方法により作製することができる。例えば、上述した修飾ピキア属酵母株に糖蛋白質をコードするDNAを導入する方法、天然型糖鎖伸長DNAの塩基配列に形質転換マーカー遺伝子とともに糖蛋白質をコードするDNAを挿入したDNAを用いて天然型ピキア属酵母を形質転換する方法、糖蛋白質をコードするDNAを有する組換えピキア属酵母株が有する天然型糖鎖伸長DNAを後発的に、本発明の修飾糖鎖伸長DNAの態様に変異せしめる方法、または、天然型ピキア属酵母株を上記の修飾糖鎖伸長DNAおよび糖蛋白質をコードするDNAで同時に形質転換する方法等が挙げられる。

【0038】組換え糖蛋白質発現系のピキア属酵母は、転写の読み枠の方向に、少なくとも、①プロモーター領域、②実質的に所望の糖蛋白質をコードするDNA及び③転写ターミネーター領域を有するものである。これらのDNAは、所望の糖蛋白質をコードするDNAがRNAに転写されるように、お互いに機能するように関連して配列される。

【0039】プロモーターとしては、*P. pastoris* のAOX1プロモーター (プライマリーアルコールオキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター)、*P. pastoris* のAOX2プロモーター (セカンダリーアルコールオキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター)、*P. pastoris* のDASプロモーター (ジヒドロキシアセトン シンターゼ遺伝子のためのプロモーター)、*P. pastoris* のP40プロモーター (P40遺伝子のためのプロモーター)、*P. pastoris* のアルデヒド デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーターまたは*P. pastoris* の葉酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーターなどが挙げられる。好ましく

は、*P.pastoris*のAOX1プロモーター (Ellis et al., Mol. Cell. Biol., 5, 111 (1985), 米国特許第4,855,231号など)であり、より好ましくは、発現効率が向上するように修飾された変異型AOX2プロモーター (Ohl, H et al., Mol. Gen. Genet., 243, 489-499, 1994年、特開平4-299984号公報)である。

【0040】なお、実質的に所望の糖蛋白質をコードするDNAの前に分泌シグナル配列をコードするDNAを有してよい。かかるDNAを有する組換え糖蛋白質発現系によれば、糖蛋白質が宿主細胞外に分泌産生されるため、所望の糖蛋白質を容易に単離精製することができる。分泌シグナル配列をコードしているDNAとしては、糖蛋白質に関連した天然の分泌シグナル配列をコードするDNA、パン酵母 α -接合因子(α MF)リーダー配列をコードしているDNA(プロセッシング部位をコードしているDNA配列を含む、Lys-Arg)、ウシリゾチームCシグナル配列のようなメタノール資化性酵母細胞で機能するシグナル配列をコードするDNA等が挙げられる。

【0041】本発明で用いられる転写ターミネーターは、プロモーターからの転写に対して転写終結信号を提供するサブセグメントを有するものであればよく、プロモーター源の遺伝子と同じもしくは異なるものであってもよく、また糖蛋白質をコードする遺伝子から取得されるものであってもよい。

【0042】本発明の発現系は、上記のDNA配列に加えてさらに選択マーカー遺伝子を含んでいてもよい。用いられる選択マーカー遺伝子としては、HIS4, ARG4, URA3, パン酵母SUC2, G418耐性遺伝子等が挙げられる。

【0043】所望の表現型に形質転換された修飾ピキア属酵母株は、当該分野で通常用いられる方法で培養することにより、糖蛋白質を産生することができる。用いられる培地には特に制限はなく、通常天然培地(YPD培地, YPM培地)等が挙げられる。培養温度は、ピキア属酵母宿主細胞の増殖および所望の糖蛋白質の産生に適した温度であることが好ましく、約20~30℃、好ましくは約23~25℃である。培地のpHも、宿主細胞の増殖および所望の糖蛋白質の産生に適したpHを適宜採用することができる。さらに、必要により通気や攪拌を加えることができる。培養後、培養上清を回収し、当該上清から自体公知の方法、例えば分画法、イオン交換、ゲル濾過、疎水相互作用クロマトグラフィーまたはアフィニティカラムクロマトグラフィー等により所望の異種蛋白質を精製取得することができる。

【0044】

【発明の効果】本発明は、ピキア属酵母に由来する糖蛋白質の糖鎖伸長に携わるタンパクおよびその遺伝子を初めて提供するものである。当該糖鎖伸長に携わるタンパクおよびその遺伝子の提供は、ピキア属酵母を宿主とす

る糖蛋白質の糖鎖の結合・伸長の機序を解明するための基礎となり得る点で有用である。また当該遺伝子の解明は、ピキア属酵母を宿主として、医薬上有用な生理活性蛋白質と同一もしくは類似の糖蛋白質を発現・産生させるために、遺伝子レベルでピキア属酵母が本来有する糖鎖伸長能を改変する方法の提供にもつながる。また、本発明の修飾ピキア酵母株は、天然型ピキア酵母株と同等の増殖能力を有し、かつ天然型ピキア酵母株に比して糖鎖伸長能が減弱もしくは消失してなるものである。よって、本発明の修飾ピキア酵母株を宿主とする発現系によれば、酵母と哺乳類細胞とで共通するERコア糖鎖と同一もしくは類似の糖鎖構造を有する医薬上有用な糖蛋白質を調製することができる。従って、本発明の修飾ピキア属酵母株は、糖蛋白質産生の宿主として有用である。

【0045】

【実施例】以下、実施例および参考例に基づいて本発明をより詳細に説明する。しかし、本発明はこれによってなんら限定されるものではない。本発明の実施例で用いるプラスミド、制限酵素等の酵素、T4DNAリガーゼ及び他の物質は市販のものであり、常法に従って使用することができる。DNAのクローニング、塩基配列の決定、宿主細胞の形質転換、形質転換細胞の培養、得られる培養物からの酵素の採取、精製等に用いられた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献により知ることのできるものである。

【0046】実施例1 ピキア属酵母由来の糖鎖伸長タンパクの遺伝子の取得

パン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由来糖鎖伸長遺伝子OCH1をPCR法で増幅してプローブとなし、ピキア属酵母の染色体遺伝子をサザン解析して、ピキア属酵母由来の糖鎖伸長に関わるタンパクをコードするDNAを探索した。

【0047】(1)PCR法によるパン酵母のOCH1遺伝子の増幅、取得

パン酵母由来糖鎖伸長遺伝子OCH1をクローニングするため、文献[The EMBO Journal vol.11 no.7 p2511-2519 (1992): p2513, Fig.2]に開示のDNA配列を基に、その蛋白翻訳領域の両末端DNAに相補的な配列にHindIII認識部位を付与したN末端プライマー: 5'-CGAAGCTTATGTCTAGGAAGTTGTCCACCTG-3'、及びC末側プライマー: 5'-CGAAGCTTATTTATGACCTGCA TTTTATCAG-3'(PCR増幅用プライマー)をDNA合成装置(ABI社製、モデル392 DNA/RNAシンセサイザー)を用いて化学合成した。当該プライマーを用いて、常法(Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1986) Laboratory course manual for methods in yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)に従って調

製した *S. cerevisiae* AH22株 (a, len2, his4, can1) (Hinnen, A. et al (1978) Proc. Natl. Sci. USA 75, p. 1929) 由来染色体DNAを鋳型として、PCR反応 (94℃で1分間、50℃で2分間、72℃で2分間/25サイクル) (DNA Thermal Cycler Model PJ2000、Perkin-Elmer社) を行った。増幅されたDNA断片についてアガロースゲル電気泳動した結果、ゲル上で明瞭な単一バンドが観察された。また、増幅されたDNA断片は設定したプライマーから予想される大きさ (1458 bp) を示した。

【0048】 (2) パン酵母由来OCH1遺伝子のサブクローニング

(1) で得られたPCR増幅断片をHindIIIで消化後、pUC19のHindIII部位にサブクローニングした。作製されたプラスミド (pKM049、図3) を数種類の制限酵素 (BamHI, EcoRI, KpnI) で消化し、その切断パターンを発表されているOCH1遺伝子の切断部位 (EMBO J. 11, 7 p2511-2519 (1992): p2512, Fig.1 及び p2513, Fig.2) と比較したところ、完全に一致していた。

【0049】 (3) OCH1遺伝子をプローブとするピキア属酵母の染色体遺伝子のサザンハイブリダイゼーション

ピキア属酵母 (*Pichia pastoris* GTS115株) をYPD培地 (1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Glucose) で、30℃、3日間培養し、Shermanらの方法 (Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1986) Laboratory course manual for methods in yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) に従って染色体DNAを調製した。得られた染色体DNAを様々な態様の制限酵素処理を行った後アガロースゲル電気泳動し、DNA断片をナイロンメンブレン (Hybond-N、アマシャム社製) にトランスファーした。(1) で得られたパン酵母由来OCH1遺伝子HindIII断片を「DIG-ELISA標識キット」(ペーリンガー・マンハイム社製) を用いて標識してプローブとし、常法によりサザンハイブリダイゼーションを行い (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)、パン酵母由来OCH1遺伝子と相同性のある遺伝子が存在するかどうかの検討を行った。

【0050】 パン酵母由来OCH1遺伝子とピキア属酵母の染色体DNAとの相同性については不明であるため、ハイブリダイゼーションの温度 (65℃, 55℃, 45℃) 及び洗浄条件 (塩濃度: 0.2~0.5×SSC、温度: 室温~42℃) について様々検討した。その結果、ハイブリダイゼーションを55℃で一夜行い、2×SSC、室温、30分、2回洗浄後、さらに0.5×SSC、42℃、30分、2回洗浄した場合に、EcoRI

消化物に対し約5kbの明瞭なバンドが観察された。ハイブリダイゼーションの温度及び洗浄条件を上記の如く緩やかにすることにより、パン酵母由来のOCH1遺伝子と相同性のある遺伝子がピキア属酵母の染色体上に存在することが示唆された。

【0051】 (4) λgt10ライブラリーの作製

(3) の結果に基づいて、ピキア属酵母の染色体DNAのEcoRI断片 (約5kb) のクローニングを行った。まず、約150μgの*P. pastoris* GTS115株由来染色体DNA (NRRL寄託番号Y-15851) を200酵素単位のEcoRIで一晩消化した後、0.8%のアガロースゲル電気泳動により約4.5~6kbのDNAを分離回収した。回収したDNAの一部を1μgのλgt10arm (「lambda gt10 vectordigested with EcoRI and dephosphorylated」、ストラタジーン社製) とリゲーションし、Gigapack II Gold Packaging Extract (ストラタジーン社製) を用いてパッケージングを行った。その結果、スクリーニングに必要な数のプラークが得られた。

【0052】 (5) プラークハイブリダイゼーション

(4) で作製した組換えファージライブラリーを80mm径の1プレートあたり200~300プラークになるようにタイトレーションを行い、ナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N、アマシャム社製) にトランスファーした。これらのフィルターを10枚作製し (全スクリーニング数; 約3000プラーク)、前記のパン酵母由来OCH1遺伝子断片をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、鮮明な14個のポジティブプラークが検出された。

【0053】 (6) λDNAの精製

(5) で検出されたポジティブプラークのうち、任意に10プラークを選び、single plaque isolationの後、Sephaglas™ PhagePrep Kit (ファルマシア社製) を用いてλDNAを抽出、精製した。精製した各DNAを数種の制限酵素 (EcoRI, BglII, HindIII, XhoI) の消化パターンをアガロースゲル電気泳動で比較したところ、10クローン中8クローンまでが同一の挿入DNA (約5kb) を有していることが分かった。

【0054】 (7) サブクローニング

そのうちの1クローンについて、挿入されたEcoRI断片をpUC19のEcoRI部位にサブクローニングして、pKM50 (図4) を作製した。

【0055】 (8) pKM50に挿入されたDNA断片の塩基配列およびアミノ酸配列の決定

pKM50に挿入されているピキア属酵母由来のEcoRI断片の塩基配列を決定した。pKM50を用いてクローニングした染色体DNA断片の制限酵素地図を作製し、さらにいくつかの制限酵素を用いてより詳細にサザン解析した結果、約2.5kbのBglII断片中にパン酵

母OCH1遺伝子との相同領域が存在することが示された。そこで、この約2.5 kbのBgIII断片のDNA塩基配列を決定した。具体的には、挿入断片を数種の制限酵素を用いて部分断片にしてpUC19にサブクローニングし、それらのDNA塩基配列をM13~40プライマーおよび Reverse primer (ファルマシアLKBバイテクノロジー) を用いて、DNAシーケンサー (A. L. F. DNAシーケンサー、ファルマシアLKBバイテクノロジー) により決定した。

【0056】 pKM50に挿入されたパン酵母OCH1 10 遺伝子と相同性を示す領域を含む遺伝子断片 (BgIII~SalI断片 (約3.0 kb)) の塩基配列を決定したところ、404アミノ酸からなる Open Reading Frame (ORF) (図4、斜線領域) が存在していた。BgIII~SalI部位までの塩基配列 (2858 bp) 及び Open Reading Frame 領域をアミノ酸に翻訳した配列を配列表配列番号1に示す。なお、かかる領域にはアスパラギン結合型糖鎖付加が生じる可能性部位 (Asn-Xaa-Ser/Thr) が2ヶ所存在していた。

【0057】 次いで、ピキア属酵母由来の上記ORF 20 領域のアミノ酸配列とパン酵母由来OCH1遺伝子由来のタンパクのアミノ酸配列とを比較した。その結果、上記で決定したピキア属酵母由来のEcoRI断片 (約5 kb) によってコードされるアミノ酸配列はパン酵母由来OCH1遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と約40%の相同性を有していた (図5)。また、該アミノ酸配列をコードするDNAレベルでの相同性は、約55%であった。図5中口で囲んで示したアスパラギン結合型糖鎖付加部位については、1ヶ所のみ相同的な領域で一致が見られた (本発明のピキア属酵母由来の糖鎖伸長 30 タンパクのAsn¹⁹⁹ 及び *S. cerevisiae* OCH1蛋白のAsn²⁰³)。アミノ酸配列から予想される分子量は、*S. cerevisiae* OCH1蛋白が55 kDaであるのに対し、ピキア属酵母由来の糖鎖伸長タンパクは46 kDaであった。

【0058】 次に、両タンパクの Hydrophobicity を比較した。その結果、図6に示すように両者は非常によく似たパターンを示した。このことから、ピキア属酵母から得られたEcoRI断片は、ピキア属酵母由来のOCH1 40 遺伝子であることが示唆された。また、パン酵母OCH1蛋白は、N末端付近に膜貫通領域 (membrane spanning domain) と思われる疎水性領域が存在しているが (Thr¹⁶~Phe³⁰)、ピキア属酵母由来の糖鎖伸長タンパクではさらに長い疎水性領域が存在していた。

【0059】 実施例2. 糖鎖伸長DNA破壊株の作製
(1) ピキア属酵母由来の糖鎖伸長DNAの Genomic S outhern 解析

実施例1でクローニングしたピキア属酵母由来の糖鎖伸長DNAを破壊した菌株を作製する目的で、まず該DNAが染色体上で単一遺伝子であることを確認するための

Genomic Southern Hybridization を行った。宿主として用いた *P. pastoris* GTS115株の染色体をBgIII, EcoRI, SphI, XbaIの各制限酵素で切断、アガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブランにブロットした。次にピキア属酵母由来の糖鎖伸長DNAの蛋白翻訳領域をコードするDNA配列を含むDNA断片 (図4、pK50のHndIII-HincII断片約900 bp、塩基配列表配列番号1記載の塩基番号1488~塩基番号2385の領域) をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。結果を図7に示す。これから分かるように、ピキア属酵母由来の糖鎖伸長DNAプローブはいずれの制限酵素を用いた場合でも単一のバンドにしかハイブリダイズしなかった。以上の結果から、ピキア属酵母由来の糖鎖伸長DNAは単一遺伝子であることがわかった。

【0060】 (2) HIS4を選択マーカーとしたピキア属酵母由来の糖鎖伸長DNA破壊株の作製
ピキア属酵母由来の糖鎖伸長DNAとその周辺の染色体断片を含むプラスミドpKM50 (図4参照) のAsu 11およびBamHI部位を消化して平滑末端にし、その間にHIS4遺伝子および可溶性高親和性IgE受容体α鎖遺伝子 (sFcεRIα) 発現ユニットを挿入して、プラスミドpKM74 (図8) を作成した。可溶性高親和性IgE受容体α鎖遺伝子 (sFcεRIα) 発現ユニットは、*S. cerevisiae* SUC2遺伝子のシグナル配列をsFcεRIα遺伝子 [Nucleic Acids Research, Volume 16 Number 8, 3584 (1988) 参照] の成熟型N末端に付加し、*P. pastoris* AOX2遺伝子のプロモーター領域および*P. pastoris* AOX1遺伝子ターミネーター領域を連結したDNA断片で、*P. pastoris* でヒト由来高親和性IgE受容体の細胞外領域 (172アミノ酸) を分泌発現することができるものである。

【0061】 該pKM74をSphI及びPstIで消化し、*P. pastoris* GTS115株 (his4) (NRRL寄託番号Y-15851) を形質転換したところ、45株の形質転換体 (HIS4) が取得できた。そこで、これらの形質転換株のうちいくつかを選び、以下の解析を行った。

【0062】 (3) GTS115/pKM74形質転換株の解析

パン酵母OCH1遺伝子破壊株について、該株は高温耐性を失っており、37℃で成育できないことが報告されている [Nakayama, K., et al. EMBO J. 11, 2511 (1992)]。そこで、(2) で得られた形質転換体について温度感受性を調べた。YPDプレートを用いて45株について、25℃、30℃及び37℃での成育をそれぞれ観察したところ、うち10株が37℃で成育できなかった。一方で、形質転換株のうち任意に10株を選び、Genomic Southern Hybridizationを行ったところ、このうちの2株 (KM74-2及びKM74-5株) の糖鎖伸

長DNAが破壊されていた。この2株はいずれも37℃で成育ができず、温度感受性とSouthern Hybridization解析は一致していることが示された。

【0063】さらに形質転換株(KM74-2株)について、より詳細なGenomic Southern解析を行った(図9)。図9に示すKM45株は、pKM74のHIS4遺伝子および可溶性高親和性Ige受容体α鎖遺伝子(sFcεRIα)発現ユニットDNA断片を、P.pastorisGTS115his4株のhis4遺伝子座に組み込ませた形質転換株で、sFcεRIα鎖蛋白を分泌発現できるものである。GTS115株、OCH1遺伝子野生株KM45株、OCH1遺伝子破壊株KM74-2株について、染色体DNAをEcoRI及びBglIIで消化後、糖鎖伸長DNAの上流域(図9中、プローブ1:図4に示すpKM50 BglII-AsuII断片 1256bp、塩基配列表配列番号1記載の塩基番号2~塩基番号1258)及び糖鎖伸長DNAの領域(図9中、プローブ2:図4に示すpKM50, HindIII-EcoT14I断片 468bp、塩基配列表配列番号1記載の塩基番号1488~塩基番号1948)をプローブとしてGenomic Southern解析を行い、KM74-2株の糖鎖伸長DNAが、導入したpKM74遺伝子断片により破壊されていることを確認した(図10、図11参照)。

【0064】(4)ヒキア属酵母の糖鎖伸長DNA破壊株の産生するsFcεRIα鎖蛋白の解析
ヒキア属酵母糖鎖伸長DNA破壊株の糖鎖付加を調べるため、糖鎖伸長DNA破壊株KM74-2およびKM74-5株と野生型株としてKM45株を3×YP+2%のメタノール(3% Yeast extract, 6% Bacto peptone, 2% Methanol)M培地で、25℃、4日間培養後、培養上清よりIgeアフィニティーカラムにより、sFcε

配列

```

AGATCTGCCT GACAGCCTTA AAGAGCCCGC TAAAGACCC GGAAAACCGA GAGAACTCTG 60
GATTAGCAGT CTGAAAAGA ATCTTCACTC TGTCTAGTGG AGCAATTAAT GTCTTAGCGG 120
CACTTCCTGC TACTCCGCCA GCTACTCCTG AATAGATCAC ATACTGCAAA GACTGCTTGT 180
CGATGACCTT GGGGTIATTT AGCTTCAAGG GCAATTTTTG GGACATTTTG GACACAGGAG 240
ACTCAGAAAC AGACACAGAG CGTTCGTAGT CCTGGTGCTC CTGACGTAGG CCTAGAACAG 300
GAATTAITGG CTTTATTTGT TTGTCCATTT CATAGGCTTG GGGTAATAGA TAGATGACAG 360
AGAAATAGAG AAGACCTAAT ATTTTITGTT CATGGCAAAT CGCGGGTTCG CGGTCGGGTC 420
ACACACGGAG AAGTAATGAG AAGAGCTGGT AATCTGGGGT AAAAGGGTTC AAAAGAAGGT 480
CGCCTGGTAG GGATGCAATA CAAGGTTGTC TTGGAGTTTA CATTGACCAG ATGATTGGCC 540
TTTTTCTCTG TTCAATTCAC ATTTTTCAGC GAGAATCGGA TTGACGGAGA AATGGCGGGG 600
TGTGGGTGG ATAGATGCCA GAAATGCTCG CAATCACCGC GAAAGAAAGA CTTTATGGAA 660
TAGAACTACT GGGTGGTGTA AGGATTACAT AGCTAGTCCA ATGGAGTCCG TTGGAAAGGT 720
AAGAAGAAGC TAAACCGGC TAAGTAACATA GGAAGAATG ATCAGACTTT GATTTGATGA 780
GGTCTGAAAA TACTCTGCTG CTTTTTCAGT TGCTTTTTCC CTGCAACCTA TCATTTTCCT 840
TTTCATAAGC CTGCCTTTTC TGTTCCTACT TATATGAGTT CCGCCGAGAC TTCCCAAT 900
TCTCTCCTGG AACATTCTCT ATCGCTCTCC TTCCAAGTTG CGCCCCCTGG CACTGCCTAG 960
TAATATTACC ACGCGACTTA TATTCAGTTC CACAATTTCC AGTGTTCGTA GCAAATATCA 1020
TCAGCC ATG GCG AAG GCA GAT GGC AGT TTG CTC TAC TAT AAT CCT CAC AAT 1071

```

RIα鎖蛋白を精製した。精製した各sFcεRIα鎖蛋白およびPNGaseF(Genzyme社製)でアスパラギン結合型糖鎖を除去したサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した(図12)。この結果、糖鎖伸長DNAが破壊されていないKM45株では高分子量のsFcεRIα鎖蛋白が観察される(図12、レーン1)のに対し、糖鎖伸長DNA破壊株であるKM74-2及びKM74-5株由来のsFcεRIα鎖蛋白では、糖鎖の伸長が抑制されたため、高分子量を示す蛋白分子種が消失していた(図12、レーン2, 3)。さらに、これらの蛋白の糖をPNGaseF(Genzyme社製)で除去したところ、同じ分子量を示すことから(図12、レーン4, 5, 6)、この分子量分布の差は、糖鎖に起因することが確認された。以上の結果から、P.pastoris糖鎖伸長DNA破壊株では糖鎖の伸長が抑制されていることが示唆された。

【0065】

【配列表】

配列番号: 1
配列の長さ: 2858
配列の型: 核酸
鎖の数: 2
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: genomic DNA
起源
生物名: P.pastoris
株名: GTS115
配列の特徴:
特徴を表す記号: CDS
存在位置: 1027-2238
特徴を決定した方法: S,P

| 25 | | | | | | | | | | | | | | | | 26 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Met Ala Lys Ala Asp Gly Ser Leu Leu Tyr Tyr Asn Pro His Asn | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | 5 | | | 10 | | | 15 | | | | | | | |
| CCA | CCC | AGA | AGG | TAT | TAC | TTC | TAC | ATG | GCT | ATA | TTC | GCC | GTT | TCT | GTC | 1119 |
| Pro | Pro | Arg | Arg | Tyr | Tyr | Phe | Tyr | Met | Ala | Ile | Phe | Ala | Val | Ser | Val | |
| 20 | | | 25 | | | 30 | | | | | | | | | | |
| ATT | TGC | GTT | TTG | TAC | GGA | CCC | TCA | CAA | CAA | TTA | TCA | TCT | CCA | AAA | ATA | 1167 |
| Ile | Cys | Val | Leu | Tyr | Gly | Pro | Ser | Gln | Gln | Leu | Ser | Ser | Pro | Lys | Ile | |
| 35 | | | 40 | | | 45 | | | | | | | | | | |
| GAC | TAT | GAT | CCA | TTG | ACG | CTC | CGA | TCA | CTT | GAT | TTG | AAG | ACT | TTG | GAA | 1215 |
| Asp | Tyr | Asp | Pro | Leu | Thr | Leu | Arg | Ser | Leu | Asp | Leu | Lys | Thr | Leu | Glu | |
| 50 | | | 55 | | | 60 | | | | | | | | | | |
| GCT | CCT | TCA | CAG | TTG | AGT | CCA | GGC | ACC | GTA | GAA | GAT | AAT | CTT | CGA | AGA | 1263 |
| Ala | Pro | Ser | Gln | Leu | Ser | Pro | Gly | Thr | Val | Glu | Asp | Asn | Leu | Arg | Arg | |
| 65 | | | 70 | | | 75 | | | | | | | | | | |
| CAA | TTG | GAG | TTT | CAT | TTT | CCT | TAC | CGC | AGT | TAC | GAA | CCT | TTT | CCC | CAA | 1311 |
| Gln | Leu | Glu | Phe | His | Phe | Pro | Tyr | Arg | Ser | Tyr | Glu | Pro | Phe | Pro | Gln | |
| 80 | | | 85 | | | 90 | | | 95 | | | | | | | |
| CAT | ATT | TGG | CAA | ACG | TGG | AAA | GTT | TCT | CCC | TCT | GAT | AGT | TCC | TTT | CCG | 1359 |
| His | Ile | Trp | Gln | Thr | Trp | Lys | Val | Ser | Pro | Ser | Asp | Ser | Ser | Phe | Pro | |
| 100 | | | 105 | | | 110 | | | | | | | | | | |
| AAA | AAC | TTC | AAA | GAC | TTA | GGT | GAA | AGT | TGG | CTG | CAA | AGG | TCC | CCA | AAT | 1407 |
| Lys | Asn | Phe | Lys | Asp | Leu | Gly | Glu | Ser | Trp | Leu | Gln | Arg | Ser | Pro | Asn | |
| 115 | | | 120 | | | 125 | | | | | | | | | | |
| TAT | GAT | CAT | TTT | GTG | ATA | CCC | GAT | GAT | GCA | GCA | TGG | GAA | CTT | ATT | CAC | 1455 |
| Tyr | Asp | His | Phe | Val | Ile | Pro | Asp | Asp | Ala | Ala | Trp | Glu | Leu | Ile | His | |
| 130 | | | 135 | | | 140 | | | | | | | | | | |
| CAT | GAA | TAC | GAA | CGT | GTA | CCA | GAA | GTC | TTG | GAA | GCT | TTC | CAC | CTG | CTA | 1503 |
| His | Glu | Tyr | Glu | Arg | Val | Pro | Glu | Val | Leu | Glu | Ala | Phe | His | Leu | Leu | |
| 145 | | | 150 | | | 155 | | | | | | | | | | |
| CCA | GAG | CCC | ATT | CTA | AAG | GCC | GAT | TTT | TTC | AGG | TAT | TTG | ATT | CTT | TTT | 1551 |
| Pro | Glu | Pro | Ile | Leu | Lys | Ala | Asp | Phe | Phe | Arg | Tyr | Leu | Ile | Leu | Phe | |
| 160 | | | 165 | | | 170 | | | 175 | | | | | | | |
| GCC | CGT | GGA | GGA | CTG | TAT | GCT | GAC | ATG | GAC | ACT | ATG | TTA | TTA | AAA | CCA | 1599 |
| Ala | Arg | Gly | Gly | Leu | Tyr | Ala | Asp | Met | Asp | Thr | Met | Leu | Leu | Lys | Pro | |
| 180 | | | 185 | | | 190 | | | | | | | | | | |
| ATA | GAA | TCG | TGG | CTG | ACT | TTC | AAT | GAA | ACT | ATT | GGT | GGA | GTA | AAA | AAC | 1647 |
| Ile | Glu | Ser | Trp | Leu | Thr | Phe | Asn | Glu | Thr | Ile | Gly | Gly | Val | Lys | Asn | |
| 195 | | | 200 | | | 205 | | | | | | | | | | |
| AAT | GCT | GGG | TTG | GTC | ATT | GGT | ATT | GAG | GCT | GAT | CCT | GAT | AGA | CCT | GAT | 1695 |
| Asn | Ala | Gly | Leu | Val | Ile | Gly | Ile | Glu | Ala | Asp | Pro | Asp | Arg | Pro | Asp | |
| 210 | | | 215 | | | 220 | | | | | | | | | | |
| TGG | CAC | GAC | TGG | TAT | GCT | AGA | AGG | ATA | CAA | TTT | TGC | CAA | TGG | GCA | ATT | 1743 |
| Trp | His | Asp | Trp | Tyr | Ala | Arg | Arg | Ile | Gln | Phe | Cys | Gln | Trp | Ala | Ile | |
| 225 | | | 230 | | | 235 | | | | | | | | | | |
| CAG | TCC | AAA | CGA | GGA | CAC | CCA | GCA | CTG | CGT | GAA | CTG | ATT | GTA | AGA | GTT | 1791 |
| Gln | Ser | Lys | Arg | Gly | His | Pro | Ala | Leu | Arg | Glu | Leu | Ile | Val | Arg | Val | |
| 240 | | | 245 | | | 250 | | | 255 | | | | | | | |
| GTC | AGC | ACG | ACT | TTA | CGG | AAA | GAG | AAA | AGC | GGT | TAC | TTG | AAC | ATG | GTG | 1839 |
| Val | Ser | Thr | Thr | Leu | Arg | Lys | Glu | Lys | Ser | Gly | Tyr | Leu | Asn | Met | Val | |
| 260 | | | 265 | | | 270 | | | | | | | | | | |

| | | | |
|----|---|-----|------|
| 27 | GAA GGA AAG GAT CGT GGA AGT GAT GTG ATG GAC TGG ACG GGT CCA GGA | 28 | 1887 |
| | Glu Gly Lys Asp Arg Gly Ser Asp Val Met Asp Trp Thr Gly Pro Gly | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| | ATA TTT ACA GAC ACT CTA TTT GAT TAT ATG ACT AAT GTC AAT ACA ACA | | 1935 |
| | Ile Phe Thr Asp Thr Leu Phe Asp Tyr Met Thr Asn Val Asn Thr Thr | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| | GGC CAC TCA GGC CAA GGA ATT GGA GCT GGC TCA GCG TAT TAC AAT GCC | | 1983 |
| | Gly His Ser Gly Gln Gly Ile Gly Ala Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Ala | | |
| | 305 | 310 | 315 |
| | TTA TCG TTG GAA GAA CGT GAT GCC CTC TCT GCC CGC CCG AAC GGA GAG | | 2031 |
| | Leu Ser Leu Glu Glu Arg Asp Ala Leu Ser Ala Arg Pro Asn Gly Glu | | |
| | 320 | 325 | 330 |
| | ATG TTA AAA GAG AAA GTC CCA GGT AAA TAT GCA CAG CAG GTT GTT TTA | | 2079 |
| | Met Leu Lys Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Ala Gln Gln Val Val Leu | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| | TGG GAA CAA TTT ACC AAC CTG CGC TCC CCC AAA TTA ATC GAC GAT ATT | | 2127 |
| | Trp Glu Gln Phe Thr Asn Leu Arg Ser Pro Lys Leu Ile Asp Asp Ile | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| | CTT ATT CTT CCG ATC ACC AGC TTC AGT CCA GGG ATT GGC CAC AGT GGA | | 2175 |
| | Leu Ile Leu Pro Ile Thr Ser Phe Ser Pro Gly Ile Gly His Ser Gly | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| | GCT GGA GAT TTG AAC CAT CAC CTT GCA TAT ATT AGG CAT ACA TTT GAA | | 2223 |
| | Ala Gly Asp Leu Asn His His Leu Ala Tyr Ile Arg His Thr Phe Glu | | |
| | 385 | 390 | 395 |
| | GGA AGT TGG AAG GAC TAA AGAAAGCTAG AGTAAATAG ATATAGCGAG | | 2271 |
| | Gly Ser Trp Lys Asp *** | | |
| | 400 | | |
| | ATTAGAGAAT GAATACCTTC TTCTAAGCGA TCGTCCGTCA TCATAGAATA TCATGGACTG | | 2331 |
| | TATAGTTTTT TTTTGTACA TATAATGATT AAACGGTCAT CCAACATCTC GTTGACAGAT | | 2391 |
| | CTCTCAGTAC GCGAAATCCC TGACTATCAA AGCAAGAACC GATGAAGAAA AAAACAACAG | | 2451 |
| | TAACCCAAAC ACCACAACAA ACACCTTATC TTCTCCCCC CAACACCAAT CATCAAAGAG | | 2511 |
| | ATGTCGGAAC ACAAACACCA AGAAGCAAAA ACTAACCCCA TATAAAACA TCCTGGTAGA | | 2571 |
| | TAATGCTGGT AACCCGCTCT CCTTCCATAT TCTGGGCTAC TTCACGAAGT CTGACCGGTC | | 2631 |
| | TCAGTTGATC AACATGATCC TCGAAATGGG TGGCAAGCAT CGTTCCAGAC CTGCCTCTC | | 2691 |
| | TGGTAGATGG AGTGTGTTT TTGACAGGGG ATTACAAGTC TATTGATGAA GATACCCTAA | | 2751 |
| | AGCAACTGGG GGACGTCCA ATATACAGAG ACTCCTTCAT CTACCAAGTGT TTTGTGCACA | | 2811 |
| | AGACATCTCT TCCCATGAC ACTTTCGGAA TTGACAAGAA CGTCGAC | | 2858 |

【図面の簡単な説明】

【図 1】 エリスロポエチンにおける Asn 結合型糖鎖の機能分担モデルを示す図である。図中、Man はマンノース、GlcNAc は N-アセチルグルコサミンおよび Fuc はフコースを意味する。

【図 2】 バン酵母における糖蛋白質の糖鎖構造モデルを示す図である。図中、M はマンノース、2 は α -1, 2 結合、3 は α -1, 3 結合、6 は α -1, 6 結合および 4 は β -1, 4 結合を意味する。また、N-linked 糖鎖中の「Ma」は小胞体 (ER) で合成されるマンノース糖を意味する。

【図 3】 バン酵母由来 OCH1 遺伝子がサブクローニングされたプラスミド pKM049 を示す図である。

【図 4】 pKM50 に挿入された遺伝子断片 (バン酵母 OCH1 遺伝子と相同性を有する P.pastoris 染色体 DNA 断片) の制限酵素地図を示す。斜線領域は、決定した塩基配列より予想される OCH1 遺伝子翻訳領域を示す。

【図 5】 バン酵母 OCH1 遺伝子がコードするアミノ酸配列 (上段) と P.pastoris 糖鎖伸長 DNA がコードするアミノ酸配列 (下段) のホモロジーを示す図である。□ は、アスパラギン糖鎖付加部位を示す。

【図 6】 バン酵母由来の OCH1 タンパク (A) と P.pastoris 由来の糖鎖伸長タンパク (B) の Hydrophobicity プロファイルを比較した図である。

【図 7】 ピキア属酵母の糖鎖伸長 DNA をプローブとし

たGenomic Southern Hybridizationの結果を、アガロースゲル電気泳動像を示す図面に代わる写真である。

【図8】 *P. pastoris* 糖鎖伸長DNA破壊プラスミド (pKM74) の制限酵素地図を示す図である。

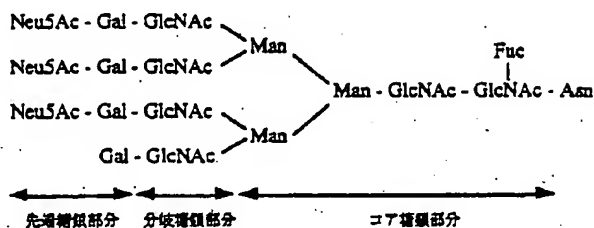
【図9】 糖鎖伸長DNA破壊株KM74-2および野生株GTS115, KM45の染色体DNAの糖鎖伸長遺伝子座近傍の構造を示した図で、図中の下線はGenomic Southern Hybridization解析に用いたプローブの位置を示した図である。なお、図中、EはEcoRIを、BgはBglIIを意味する。

【図10】 糖鎖伸長DNA破壊株KM74-2および野生株GTS115, KM45について図9で示したプローブ1を用いてGenomic Southern Hybridization解析を行った結果を示す図面に代わる写真である。

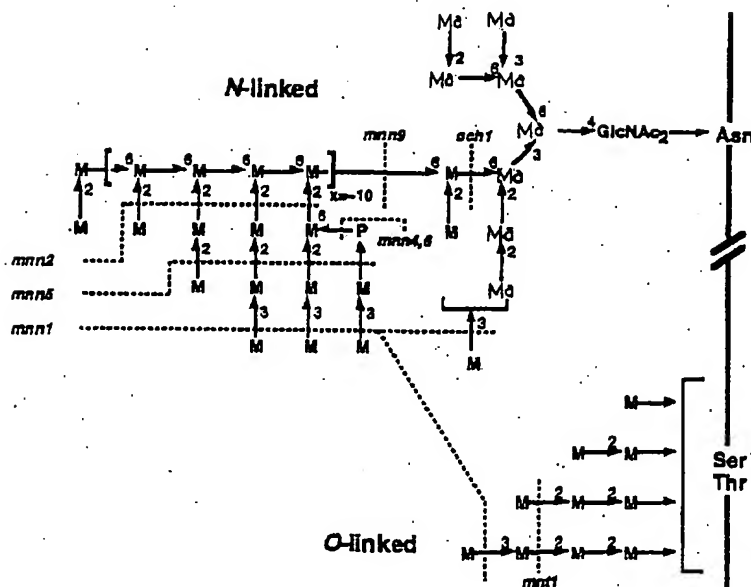
【図11】 糖鎖伸長DNA破壊株KM74-2および野生株GTS115, KM45について図9で示したプローブ2を用いてGenomic Southern Hybridization解析を行った結果を示す図面に代わる写真である。

【図12】 *P. pastoris* 糖鎖伸長DNA破壊株が産生するsFcεRIα鎖蛋白についてSDS-PAGE解析を行った電気泳動像を示す図面に代わる写真である。1: sFcεRIα (KM45)、2: sFcεRIα (KM74-2)、3: sFcεRIα (KM74-5)、4: PNGaseF処理KM45-sFcεRIα、5: PNGaseF処理KM74-2-sFcεRIα、6: PNGaseF処理KM74-5-sFcεRIα

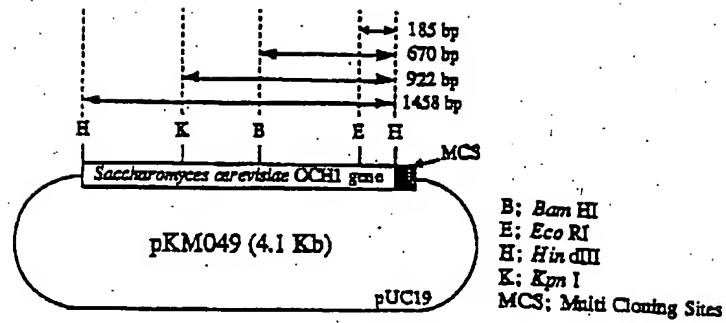
【図1】



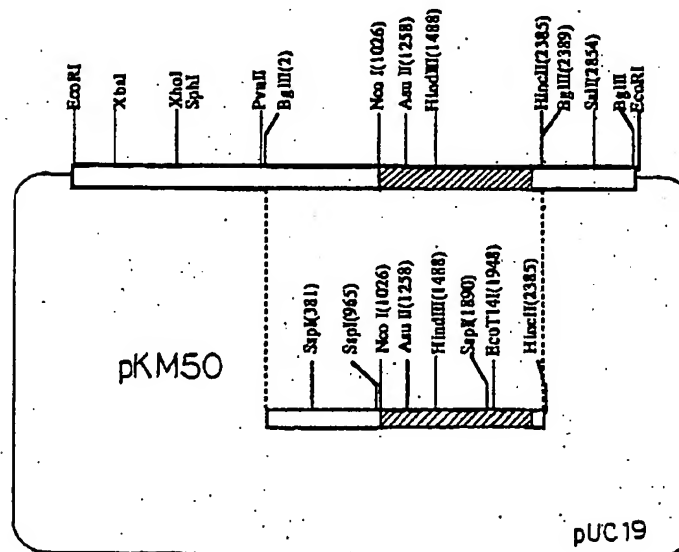
【図2】



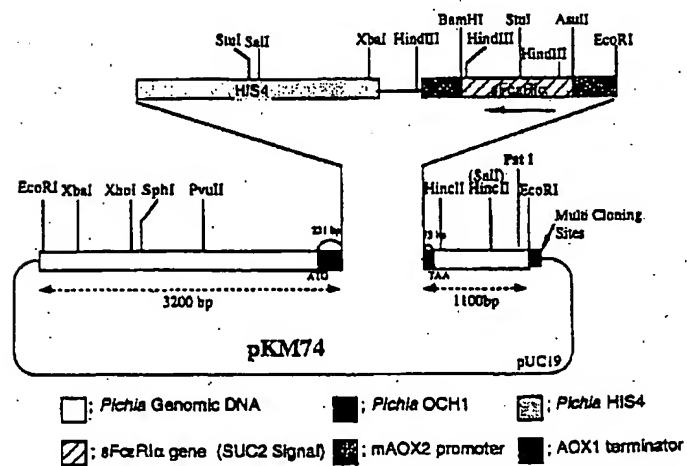
【図3】



【図4】



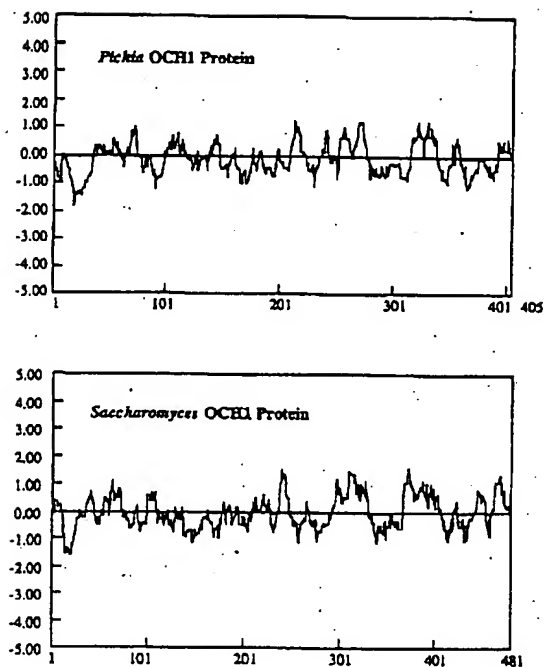
【図8】



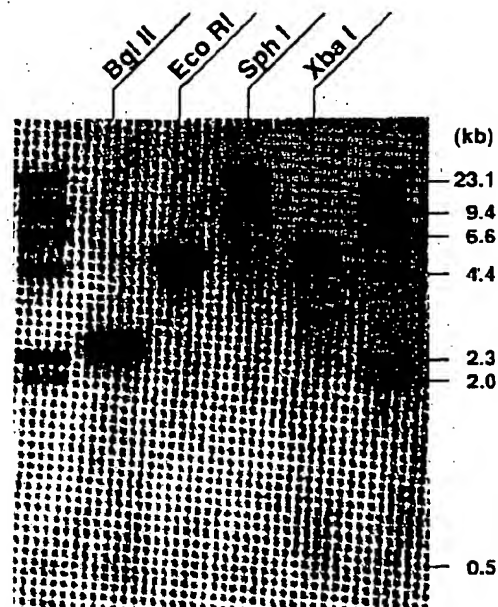
【図5】

| | | |
|--------|--|-----|
| P-OCH1 | MA-KADGSLLYYNPHNPPRRYYFYMAIFAVSVICVL--YGPSQQ---LSS | 44 |
| S-OCH1 | MSRKL--SHLIAT-----RSKT---I--V-VT-VLLIY--SLLTFHLSN | 34 |
| P-OCH1 | PKIDYDPLTLR-----SLDL-K-TLEAF--S--Q---LSPG-TVED----- | 75 |
| S-OCH1 | -KR-----L-LSQFYPSKDDFKQTL-PTTSHSQDINLKKQITVNKKKNQL | 77 |
| P-OCH1 | -NLRRQLEFHFPPYRSYEPFPQHIWQTKVSPSDSSFPKNF-----KDL-GE | 119 |
| S-OCH1 | HNLRDQLSFAPPYDSQAPIQRVWQTKVGADDKNFPSSFRTYQKTWSG- | 126 |
| P-OCH1 | SWLQSPNYDHFVIPDDAAWELIHH-E--YERVPEVLEAFHLLPEPILKA | 166 |
| S-OCH1 | SY---SPDYQYSLISDDSI---IPFLENLYAPVPVIVIAQAFKLMPGNILKA | 170 |
| P-OCH1 | DDFRYLILFARGGLYADMDTMLLKPIESWLTFFNET-----IGGV | 205 |
| S-OCH1 | DFLRYLLLFARGGIYSDMDTMLLKPIDSWPSQNKSWLNNIIDLNKPIPY- | 219 |
| P-OCH1 | KNNA-----GLVIGIEADPDPRPDWHDWYARRIQFCQWAIQSK | 242 |
| S-OCH1 | KNSKPSLLSSDEISHQFGLVIGIEADPDPRDDWSEWYARRIQFCQWTIQAK | 269 |
| P-OCH1 | RGHPALRELI-----VR--V-VSTTL--R-----K-- | 262 |
| S-OCH1 | PGHPILRELILNITATTLASVQNPQVGVSEMIIDPRFEEDYNVNYRHKRRH | 319 |
| P-OCH1 | -E--K-SGYL-NMVEGK--DRGSDVMDWTGPGIFTDTLFDYMTNV---NT | 302 |
| S-OCH1 | DETYKHSE-LKNN---KNVD-GSDIMNWTGPGIFSDIIFEYMNVLRYN- | 363 |
| P-OCH1 | IGHSGQGIGAGSAYYNALSL--EERDALSAR-P-----NGEML-KE--KV | 341 |
| S-OCH1 | ---SD--ILLINP--N-LNKNDDEEGSE-SATTPAKDVDNDT-LSKSTRKF | 403 |
| P-OCH1 | PGKYAQ--QVVL---WEQFTNLRSPKLI-DDILILPITSFSPGIGHSGAG. | 385 |
| S-OCH1 | YKKISESLQSSNSMPWEFFSFLKEPV-IVDDVMVLPIITSFSPDVGQMGAG | 452 |
| P-OCH1 | --DLNHHLAYIRHTFEGSWK-D..... | 404 |
| S-OCH1 | SSDDKM--AFVKHMFSGSWKEDADKNAGHK..... | 480 |

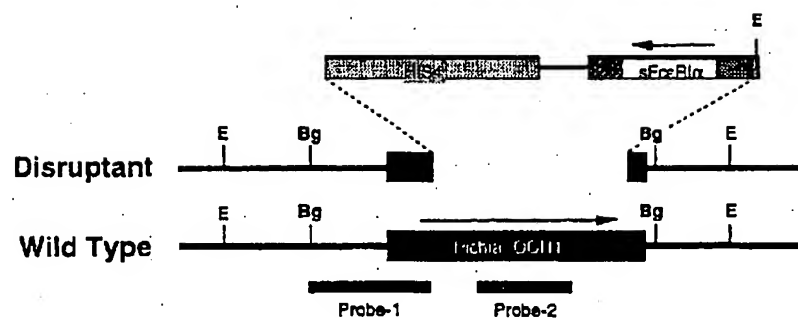
【図6】



【図7】



【図9】



【図10】

Probe-1

| GTS115 | | KM45 | | KM74-2 | |
|--------|----|------|----|--------|----|
| E | Bg | E | Bg | E | Bg |



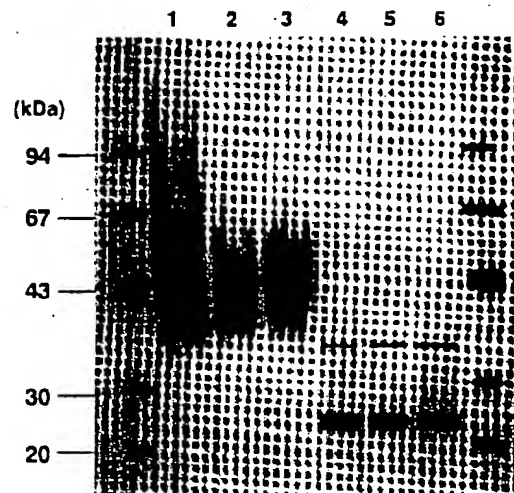
【図11】

Probe-2

| GTS115 | | KM45 | | KM74-2 | |
|--------|----|------|----|--------|----|
| E | Bg | E | Bg | E | Bg |



【図12】



フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|---------|---------------|---------|
| C 1 2 P 21/00 | | 9162-4B | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| /(C 1 2 N 9/10 | | | | |
| C 1 2 R 1:84) | | | | |
| (C 1 2 N 1/19 | | | | |
| C 1 2 R 1:84) | | | | |
| (C 1 2 N 15/09 | Z N A | | | |
| C 1 2 R 1:84) | | | | |
| (C 1 2 P 21/00 | | | | |
| C 1 2 R 1:84) | | | | |

(72)発明者 羅 智靖

千葉県千葉市花見川区花園2-14-13